

## マンガン造影磁気共鳴画像法 (MEMRI) の実際

青木伊知男<sup>1</sup>, 河合裕子<sup>2</sup><sup>1</sup>放射線医学総合研究所分子イメージング研究センター<sup>2</sup>明治国際医療大学医療情報学ユニット

## はじめに

1973年にPaul C Lauterburが、硫化マンガンを世界初のcontrast mediaとしてNature誌に紹介して以来<sup>1)</sup>, マンガン(Mn)はガドリニウム(Gd)と並び,<sup>1</sup>H-NMR/MRIにおける最も基本的かつ有名な陽性造影剤として知られる。Gdと比較して、毒性が強いという印象や安定的なキレート剤の開発が遅れたことから、臨床的にはGdのキレート製剤の使用が主流となった。一方で、Mnを使ったMRI研究に大きな転機が訪れたのは、1997年にCarnegie Mellon大学に在籍していたAlan P Koretskyと、その大学院生だったYi-Jen Linが、神経細胞の脱分極に伴うカルシウム・イオン(Ca<sup>2+</sup>)の流入を、2価のマンガンイオン(Mn<sup>2+</sup>)を用いて検出した報告からである(Fig. 1A)<sup>2)</sup>。Gdキレート製剤が、その構造自体に明確な機能性や集積特性をもたないのに対して、Mn造影剤がCa<sup>2+</sup>チャンネルに依存する機能性をもつという報告は、基礎医学および生物医学の研究者から注目を集め、それ以来、Mnを使ったMRIに関する研究が急激に増加し、多様な適用事例を生み出した<sup>3)</sup>。1998年に、Pautlerらが、神経経路トレースに塩化Mnを使用した論文で、マンガン造影MRI(manganese-enhanced MRI; MEMRI)という

言葉が登場し、それ以降、MnあるいはMn<sup>2+</sup>の特性を生かした画像法の総称としてMEMRI(注:邦訳としては、「マンガン造影MRI」)を使用する。「造影」はX線の透過しにくい物質が形成する「影」という意から始まり、近年ではX線以外の手法にも広義に利用されている。「造影」という用語は、MRIが形成するコントラスト機序を正確には表現しておらず、むしろ「増感」「増強」等の表現がより適切と考えるが、本稿では臨床でも広く普及している「造影」の用語で統一するという呼称が使われるようになった。2005年以降は、国際磁気共鳴医学会(ISMRM)でMEMRIとしての独立したセッションが組まれるなど、一つの研究分野として確立されつつある。筆者らは1997年頃にマンガン造影MRIを用いた研究に着手し、ダイナミック撮像によるMEMRIの提案<sup>4)</sup>や神経構造MEMRIの開発(Fig. 1B)<sup>5)</sup>など、いくつかの貢献を行ってきた。本稿では、基礎的な生物医学研究において様々な分野に応用されるマンガン造影MRIについて、便宜上の分類を試み、その有用性と問題点を紹介するとともに、その手技や撮像の実際について、実験動物用いた研究に役立つよう、筆者らの経験を含めて紹介したい。

キーワード manganese, MRI, functional contrast agent, molecular imaging, small animal

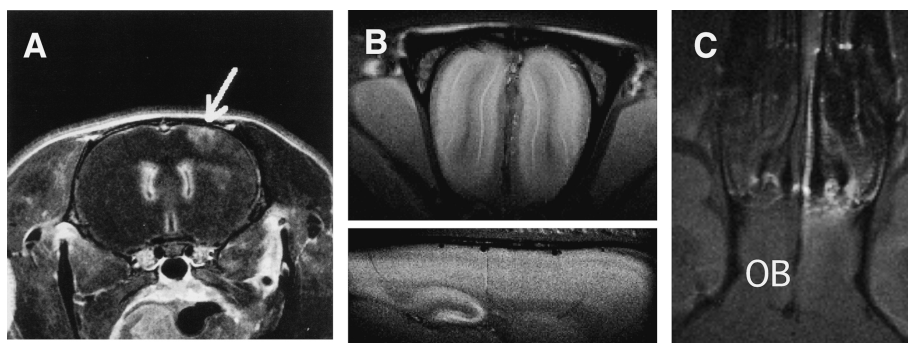


Fig. 1. Classification of manganese-enhanced MRI (MEMRI)

A : Activity-induced manganese-enhanced MRI (AIM MEMRI) (Ref. Lin YJ, Koretsky AP, Magn Reson Med 1997; 38: 378-388). Somatosensory stimulation was performed after 25% mannitol injection and manganese administration. Signal intensity in the primary sensory area was enhanced in the T<sub>1</sub>-weighted MRI.

B : Neuro-architectural MEMRI. MnCl<sub>2</sub> was systemically administered to an intact rat. MEMRI was acquired 4 days after the Mn administration (Upper : transaxial plane of olfactory bulb, Lower : sagittal plane of hippocampus). The layer structure of the olfactory bulb, cortex, and hippocampus were clearly enhanced.

C : Tract tracing MEMRI. MnCl<sub>2</sub> was injected into the nasal cavity of an intact rat. MEMRI was acquired 1 hour after the Mn administration (horizontal plane of rat frontal cortex (OB : olfactory bulb)). The neural tract from the olfactory nerve to the olfactory bulb was clearly enhanced. Note that the olfactory glomerulus between the olfactory nerve and olfactory bulb was also observed as white dots.

## 分 類

マンガン造影 MRI を広義に定義するならば、Mn 造影剤を使用した MRI 撮像法や研究手法の総称となるだろう。また狭義には、2 価の陽イオン Mn<sup>2+</sup> の特徴を生物学的特性に応用した MRI を使った実験法を示すと考える。本稿では、脳神経系への適用を中心に紹介し、便宜上、次のように分類する。

### 1) 神経賦活マンガン造影 MRI (Fig. 1A)

血液脳関門 (blood brain barrier; BBB) を破壊させる等の方法で、Mn<sup>2+</sup> を直接脳に送り込み、神経細胞の脱分極の際に生じる Ca<sup>2+</sup> の細胞内流入を観察する方法で、activity-induced MRI (AIM MRI)<sup>6)</sup> または activity-in-

duced MEMRI (AIM-MEMRI)<sup>3)</sup> と呼ばれる。

### 2) 神経構造マンガン造影 MRI (Fig. 1B)

BBB は正常のまま、全身性に Mn<sup>2+</sup> を投与し、主として血液脳脊髄液関門 (blood cerebral spinal fluid barrier) を通過した Mn が、1 ~ 数日後に脳の微細構造を描出する方法で、neuro-architectural MEMRI あるいは cyto-architectural MEMRI と呼ばれる<sup>5)</sup>。

### 3) 神経経路トレース・マンガン造影 MRI (Fig. 1C)

Mn<sup>2+</sup> を末梢あるいは脳内に局所投与し、神経軸索など神経経路を描出する方法で、MEMRI による neuronal tract tracing (神経経路トレース)<sup>7)</sup> と呼ばれる。

### 4) その他のマンガン造影 MRI

2010 年 6 月 7 日受理 2010 年 8 月 5 日改訂

別刷請求先 〒263-8555 千葉市稲毛区穴川 4-9-1 放射線医学総合研究所分子イメージング研究センター  
青木伊知男

脳以外への臓器に対しても、細胞標識、心臓、腫瘍、消化管など幅広い応用が報告されている。現在では使用頻度が低下しているが、欧米で臨床応用された Mn-DPDP (manganese dipyridoxylidiphosphate, Teslascan<sup>®</sup>, GE 社製) による肝腫瘍造影の報告が多く、また日本で臨床応用された消化管造影の経口剤として Mn<sup>2+</sup> を用いる手法 (MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, ポースデル内用液<sup>®</sup>, 明治乳業社製) がある。本稿において、これらは総称して「マンガン造影 MRI」の邦訳を用いる (注: 一部の論文に、「Mn-DPDP enhanced MRI」という表現も見られるが、遊離した Mn<sup>2+</sup> を利用してコントラストを得ている点から、フリーの Mn<sup>2+</sup> を投与するマンガン造影 MRI との本質的な差は小さいと考える)。

### マンガンの特徴と毒性

Mn<sup>2+</sup> は、5 つの対電子をもつ高い T<sub>1</sub> 緩和能および T<sub>2</sub> 緩和能の両方をもつ物質であり、7T-MRI の場合、およそ 1 mM 強の濃度をピークに T<sub>1</sub> 強調画像法 (TR/TE = 400/10 ms, スピンエコー法) で強い信号上昇をもたらし、2 mM を超えた濃度では T<sub>2</sub> の短縮による信号低下をもたらす。生体において 2 mM 以上の濃度に達することは希であるため、通常は T<sub>1</sub> 強調画像法における「陽性造影剤」として作用すると言っても良い。マンガン造影 MRI が注目される理由は、このような良好な陽性造影剤としての性質に加えて、前述のように、一定の条件下において Mn<sup>2+</sup> が、Ca<sup>2+</sup> と似た挙動を示す (擬態する) 点にある<sup>8),9)</sup>。すなわち、Ca<sup>2+</sup> そのものの動きではないものの、Ca<sup>2+</sup> に擬態した Mn<sup>2+</sup> の挙動を、MRI の特徴を生かして非侵襲的、高い空間分解能と組織コントラストで、かつ 3 次元的に観察が可能になる。

Mn は歴史的にはマンガン中毒を起こす毒物として知られ、1837 年に Couper が軟マンガ

ン鉱の工場で働く労働者の臨床報告を皮切りに 1930 年代から 1960 年代にかけて世界各国で報告されている。マンガン中毒では、精神分裂症に似た精神障害や、Parkinson 様の神経症状を呈し、基底核の神経節細胞の壊死、瘢痕化、萎縮であり、特に線条体および淡蒼球の血管周囲の壊死を特徴とする。最近では、鉱山での発症報告は皆無となっているが、長期の中心静脈栄養 (TPN) によるマンガン中毒の症例が報告されており、Mn 含有量 20 μmol/日投与で 3~4 か月経過した場合、Parkinson 様症状を呈し、MRI で淡蒼球における高信号が観察される。そのため、現在では Mn 含有量を 1 μmol/日 (MnCl<sub>2</sub> で 0.2 mg/日) に減らした製品 (エレメンミック注, 味の素製薬) 等が流通している。

一方、Mn は生体における必須元素であり、くるみ、アーモンドなどのナッツ・穀類、生姜やしそなどの野菜に含まれ、とりわけお茶には、一杯換算で 1.3 mg と多量に含まれており、成人 1 日の平均摂取量は 2~7 mg 程度 (日本では 3~4 mg) と報告される。Mn は古くから、身体や骨の成長、卵巣機能の正常化、精巣の変性防止に必要であることが動物実験によって示され、またヒトにおいても正常な骨形成やコンドロイチン硫酸の合成に必要であることが報告されている<sup>10)</sup>。1989 年、米国食品医薬品局は、不明確な点を残すものの、マンガンの推定安全適正 1 日摂取量 (estimated safe and adequate daily dietary intake; ESSADI) を 4 mg/日、最大無作用量を 10 mg/日と設定した<sup>10),11)</sup>。また中心静脈栄養に関しては、米国医学協会・食品医薬品局は 2.7~14.5 μmol/日 (0.15~0.8 mg/日) とするなど、一定量の摂取が必要となる。Mn は体外排泄に関しては多くの研究報告があり、大部分が肝臓から胆汁へ排出され、補助的に脾臓、十二指腸、空腸、回腸など消化管からの排泄も存在する<sup>12),13)</sup>。

このように、Mn は慢性的な過剰摂取によってマンガン中毒とも呼ばれる Parkinson 様の神

経変性疾患を呈する負の側面がある一方、欠乏によっても成長不全を生じる生体必須元素の一つであり、また明確な排出機構をもっている。マンガン造影 MRI の実験デザインにおいては、これらマンガンの特徴と問題点を把握した上で、必要に応じて、細胞変性の有無を組織切片上で観察するなど、必要な確認を実施することが望ましい。

### 「神経賦活マンガン造影 MRI」

#### Activity-induced MEMRI (AIM-MEMRI)

神経賦活マンガン造影 MRI (AIM-MEMRI) は、神経細胞の賦活を検出する脳機能画像法の一つとして開発された手法である<sup>2)</sup>。Ogawa らの開発した blood oxygen level dependent (BOLD) による脳機能画像法 (fMRI) が<sup>14)~16)</sup>、神経細胞の賦活から生じる血管反応という 2 次的な現象を反映するのに対して、AIM-MEMRI は、神経細胞の脱分極の際に生じる細胞内への  $\text{Ca}^{2+}$  流入を、 $\text{Mn}^{2+}$  に置き換えることで直接可視化することができる点が最も大きな特徴である。したがって、血流の増減の影響を受けず<sup>2)</sup>、また一度流入した  $\text{Mn}^{2+}$  は細胞内に一定時間留まるため長時間をかけた高空間分解能や 3D での撮像が可能などのメリットがある。MRI のための「機能的染色法」という見方もできる。一方、完全に非侵襲的な BOLD 法とは異なり、 $\text{Mn}^{2+}$  の投与が必要な点、投与した  $\text{Mn}^{2+}$  の大部分は BBB を通過しないため一時的に BBB を破綻させて造影剤を脳内に送達させる必要がある点、および麻酔深度によって信号上昇が大きな影響を受ける点などの問題点もある。

1997 年に Lin と Koretsky の論文が発表された前後、筆者らは、その手法の再現を試み一定の結果を得たが<sup>17)</sup>、麻酔深度が浅く不安定なため、容易に安定した信号を検出できなかった。つまり、麻酔深度が深すぎると、信号上昇は観察されず、浅すぎると脳全域に過剰な Mn

が取り込まれて飽和した。その問題を解決するために、動的スキャンによる実験手法と解析を提案した<sup>4)</sup>。この方法は、実験手法に一定の解決をもたらしたが、後述のように、傾斜磁場コイルが大きな音を出す実験系ではうまく機能しなかったため、結局、本手法を実施するためには、事前に麻酔深度の最適化について試行錯誤を行う必要性が残っている。Duong らは、脳循環と AIM-MEMRI の同時取得を行い、脳機能マッピングとしての手法を洗練させ<sup>18)</sup>、国内では視床下部の脳賦活評価に利用できることが、c-Fos 発現との比較において示された<sup>19)</sup>。最近では、Lu らがコカインによる脳賦活マッピングを報告し、薬剤負荷による脳反応を検出する手法を提示した<sup>20)</sup>。また、ラット脳皮質における spreading depression の観察<sup>21)</sup>、barrel 野の賦活<sup>22)</sup>などの報告がある。以下、AIM-MEMRI の手法を概説し、その問題点や実験プロトコールについて論じた。

#### 神経賦活マンガン造影 MRI (AIM-MEMRI) の手法

本法の実験手法の流れは、1) BBB を破綻、2) Mn の投与と感覚刺激、3) MRI 撮像となる。本法は、麻酔深度や脳圧の制御など、注意深く実施する必要がある。他のマンガン造影 MRI の手法と比較して、実験準備が複雑で、安定的な結果が得られるまで、麻酔深度など一定の条件検討が必要となる。一方で、極めて繊細な感覚刺激に対する脳賦活の検出が可能であり、MRI において、脱分極による  $\text{Ca}^{2+}$  の流入を反映した脳機能マップを作製可能な唯一の方法である。

本法には、感覚刺激を MRI の外部で行い、その後に MRI を撮像する手法<sup>2)</sup>と、動的に撮像をしながら内部で行う手法<sup>4)</sup>が存在するが、後者は撮像の際に生じるノイズが浅麻酔での生理状態に大きな影響を与えるため(後に詳述)、まずは MRI の外部で刺激を実施する手法について述べる。

## 1. AIM-MEMRI 実験手法の例

実験目的は、前肢通電による体性感覚刺激に対する脳賦活を検出するものとする。MRI の外部で可逆的に BBB を破綻させた後、 $Mn^{2+}$  を投与しながら刺激を行い、刺激終了後に撮像する。

$Mn^{2+}$  は BBB を通過しないという報告もある<sup>23),24)</sup>一方、通過するという報告も数多く存在する<sup>25)~30)</sup>。しかし、投与後数分~数 10 分という短時間では、MRI で検出可能な濃度には達しないと考えられるため<sup>5)</sup>、BBB を破綻させて  $Mn^{2+}$  を送り込む手法が、最も確実に脳賦活を検出できる手法である。ここに記した手法は、Lin らの論文<sup>2)</sup>および彼女の学位論文<sup>6)</sup>を基に、筆者らの経験を加えたものであり<sup>4),31)</sup>、本論文で初めて発表する。

- 1) 麻酔：ラット (150~250 g 程度) に挿管し、2.5% isoflurane で麻酔を維持、直腸温をモニターして維持する。
- 2) カニューレーション：大腿動脈と静脈に PE-50 などのポリエチレン・チューブをカニューレーションし、動脈血圧をモニターする。
- 3) 脳圧上昇の予防：BBB 破綻後の過度な脳圧上昇を防ぐために、10% mannitol の事前投与を開始する。血圧をチェックしながら、1.8~2.0 ml/h 程度の速度で、次項 1~4 の手技中、約 30~45 分程度投与し、少なくとも 2.7 ml/kg (300 g のラットに対して 0.8 ml 程度) 以上投与する。
- 4) 頸動脈のカニューレーション：BBB を破綻させるために 20~25% mannitol を投与するために、頸動脈に PE-50 チューブを留置する。この際、総頸動脈 (CCA) から内頸動脈 (ICA) の血流を確保するため、外頸動脈 (ECA) 遠位からチューブを挿入し、CCA との分岐点に先端を留める。(以下、手術手技の例) (1) CCA, ICA, ECA の分岐部を露出させ、ECA に 3 本の手術糸を通す (Fig. 2A)。3 本の糸はそれぞれ、ECA の永久閉塞、PE-50 チューブの固定、および ECA-CCA 分岐部の一時的血流遮

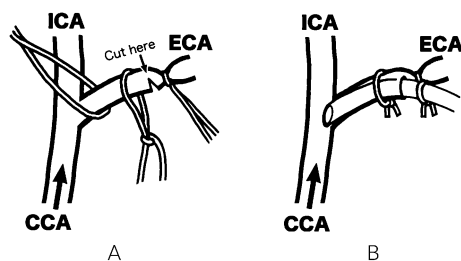


Fig. 2. Cannulation of carotid artery for AIM-MEMRI

A : Preparation for cannulation of the carotid artery (CCA ; common carotid artery, ICA ; internal carotid artery, ECA ; external carotid artery). A polyethylene tube (PE-50) was cannulated from the ligated ECA to CCA. Blood flow from the CCA to the ICA was maintained during the preparation.

B : Cannulation of carotid artery for MEMRI. The tip of the polyethylene tube (PE-50) was placed in furcation between CCA and ICA.

- 断、に使用する。(2) ECA の遠位を、手術糸を用いて永久閉塞させる。(3) ECA-CCA 分岐部にかけて糸を引っ張ることで、一時的に血流遮断する。(4) ECA の一部に小孔を開けて、遠位から PE-50 チューブを挿入、その先端を一時的血流遮断している ECA-CCA 分岐部に置く。(5) PE-50 チューブを手術糸を使って固定する。(6) ECA-CCA 分岐部の血流遮断を解除する (Fig. 2B)。これらの手術操作は、3) の 10% mannitol の投与中に実施し、投与終了後、時間を空けずに、次の 5) の手順に進む。
- 5) 麻酔の切替 1：体性感覚刺激に適した麻酔に切り替える。ここでは、propofol (10 mg/ml, AstraZeneca, Japan) をインフュージョン・ポンプを使って、1.0 ml/h で開始する。次項 6) の BBB 破綻が終了するまで、propofol と 2.5% isoflurane の併用となる。
- 6) BBB の破綻：20~25% の mannitol を ECA から、2.0 ml/300 g の投与量で、0.15 ml/5 s (0.03 ml/s) の速度で投与し、BBB を破綻させる。この時、投与速度は BBB 破綻が脳内で

均一に達成できるかどうかに影響すると考えられるため、秒単位で経過時間をカウントするなど、できるだけ正確に実施する。20~25%のmannitolは結晶化しやすく、とりわけ冬期には投与中に再結晶化して、脳塞栓が生じる危険性がある<sup>32)</sup>。投与前はインキュベーターで40~45°C程度に保温し、投与前に40°C程度に温めた生理食塩水を流す等により、チューブ内の温度を上昇させた後に投与することが望ましい。また、BBB破綻が生じた際に、血圧をやや低めに保つ方が、脳圧の急激な変化による脳浮腫などの障害が生じにくいと考えられるため、ここではpropofolと2.5% isofluraneを併用し、90 mmHg前後の血圧下で20~25% mannitolを投与する。BBBの破綻は、一定時間(おそらく60~90分程度)で回復するため、この20~25% mannitol投与時刻を記録する。

7) 麻酔の切替2: 20~25% mannitolの投与後は、血圧の変動が観察される。一般的には、一定の上昇が観察され、その後、数分程度で安定する。安定を待ってから、2.5% isofluraneの麻酔を停止し、propofolのみとする。

8) 待ち時間: 2.5% isofluraneの麻酔を停止してから、少なくとも5分程度待つ。これは、isofluraneの影響が消失するのを待つことに加えて、BBB破綻後に生じる脳圧の変化による影響を回避するためである。Isoflurane麻酔の影響を完全に除外するには、脳波などのモニターを併用し、実際にはもう少し待つ必要があるが、BBB破綻は徐々に回復するため、実験目的に応じた、適切な待ち時間を設定する必要がある。

9) 麻酔深度の最適化: Propofolの投与速度を調節して、感覚刺激に対して、適切な反応が生じる麻酔深度に調節する。一般的に、麻酔深度が浅すぎると、脳全体にMn集積による信号が観察され、深すぎるとMn集積が生じなくなる。また、感覚刺激を認知するような浅い麻酔の場合、刺激自体や周囲の環境が、麻酔深度を変化させる(血圧の変化として観察される)。

筆者らの実験系では、痛みを伴わない刺激の場合、ラットで0.8 ml/hのpropofol投与速度で良好な結果が得られた(これはヒトでの投与量よりも大きい、動物種差によるものと考えられる)。痛みや強い刺激を使用する場合や、MRIの内部で撮像音が聞こえる場合は、propofolの投与速度を適切に設定する必要がある。

10) Mn投与と刺激: 浸透圧を調整した25 mM MnCl<sub>2</sub>水溶液(調製法は後述)を約12 ml/h, 0.6 ml程度、インフュージョン・ポンプでECAから投与しながら、体性感覚刺激を実施する。Mnが生体内に入り始めると、血圧の変動が見られるので、血圧が95 mmHg程度になるよう、投与速度を調整しても良い。MnCl<sub>2</sub>の投与量と持続時間は、実験によって調整する必要があるが、3分以下の刺激時間で十分と考えられる。Mn投与中は、様々な刺激を感受し得るため、例えば、音や光などの予期せぬ刺激が混入しないように注意する。また、propofol麻酔下では、刺激が強すぎると動物が覚醒することもあるため、事前に適切な刺激強度と麻酔深度を設定し、必要であれば倫理委員会等の承認を得ることが望ましい。

11) 麻酔の切替3: 刺激終了後、2.5% isoflurane麻酔を再開する。再開後、血圧の下降が観察されたら、propofol麻酔を停止する。

12) 待ち時間: 2.5% isoflurane麻酔に切り替えてから、少なくとも5~10分程度維持し、血中のMn濃度が低下し、また麻酔深度が深くなるまで、静寂な環境を保つ。Mnの血中半減期は、4.7分との報告がある<sup>33)</sup>。

13) MRI撮像: 動物を注意深くMRI撮像用クレードルに移し、撮像を行う。撮像手法は、T<sub>1</sub>強調画像法あるいは、それに準じた手法を用いる。撮像時間は、次に示すBBB破綻の確認を行うため、45分以内(最大でも60分程度)が望ましい。

14) BBB破綻の評価: 手術手技や生理状態、およびmannitolの投与条件が同一であれば、

BBB は mannitol が投与された半脳において、ほぼ均一に破綻する。しかし、投与条件のばらつきや脳血管走行の奇形などにより、時に一部の脳領域で BBB の破綻が不完全となることもある。そのため、MRI 撮像終了後に BBB が均一に破綻していることを確認することが望ましい（論文化した際に査読者から、確認を求められることがある）。その方法として、(1) エバンスブルーなどを投与して組織学的に確認する、(2) Mn と glutamate の混合液を投与して MRI で確認する、などの方法がある。前者は、手間がかかるものの、組織自体に損傷が生じないため、他の組織評価と併用できる可能性がある。後者は簡便であるものの、L-glutamic acid 投与によって、細胞の損傷が生じる可能性がある。ここでは、簡便な後者の手法を紹介する。前出の浸透圧調整済みの  $\text{MnCl}_2$  (25 mM, 0.5 ml) と L-glutamic acid (10 mg/ml, 0.5 ml) と

混合し、ECA から投与し、直後に  $T_1$  強調画像を撮像する。BBB が開いていれば、高濃度の L-glutamic acid によって脱分極が誘起され、 $\text{Mn}^{2+}$  が蓄積するため、全脳ではほぼ均質な信号上昇が観察できる (Fig. 3A)。信号上昇が不均一な場合 (Fig. 3B) は、失敗例として報告し、統計的検討からデータを除外するか、あるいは L-glutamic acid による信号上昇が観察された脳領域に絞った議論を行う。動物種や投与条件によっても異なるが、BBB 破綻後 90 分には、BBB の透過性が正常近くまで回復するため、BBB 破綻の評価はできるだけ早い時期に行うことが望ましい。

## 2. $\text{MnCl}_2$ 水溶液の調製

本実験に使用する  $\text{MnCl}_2$  水溶液は、浸透圧を生体に近づけたものが望ましい<sup>34)</sup>。100~120 mM 程度の高濃度  $\text{MnCl}_2$  は、急速に静注すると、心筋の電子伝達系を阻害し、心停止を

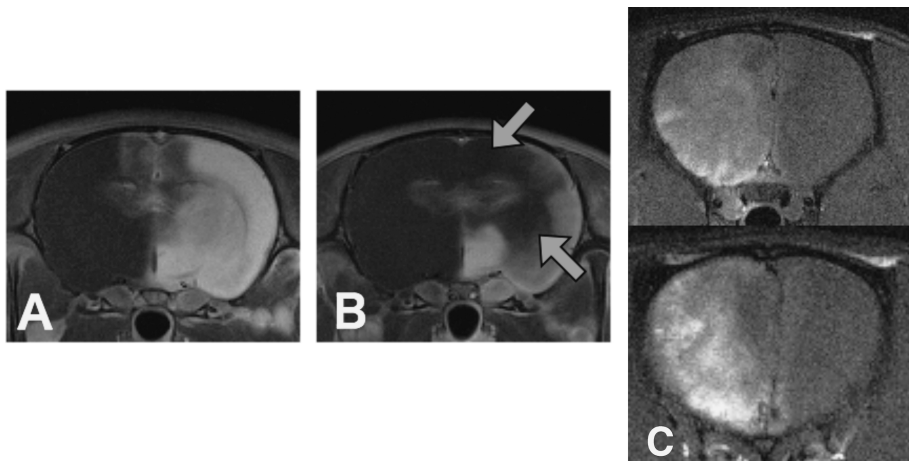


Fig. 3. Validation of BBB disruption for AIM-MEMRI

A : Validation of BBB disruption using Mn and L-glutamic acid mixture administration. Signal enhancement means higher permeability of the BBB. In this model, homogeneous enhancement was observed in the corresponding hemisphere.

B : In this example, inhomogeneous enhancement was observed in the corresponding hemisphere. This means that BBB disruption using mannitol administration was defective.

C : BBB disruption sometimes causes brain damage. In this case, cold 25% mannitol was used to disrupt the BBB without pre-conditioning with 10% mannitol. Recrystallized 25% mannitol may embolise and cause brain damage. In addition, brain swelling was observed.

生じるなどの毒性があるため、実験中に生じるチューブのつなぎ替えやシリンジの「空送り」の際に、不用意に動物に投与されないように注意する。

1)  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (分子量 197.9, Sigma-Aldrich 社製など) を蒸留水に溶かし、100~120 mM 規準液を作成する。通常は、19.79 g の  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  を 1 L の蒸留水に溶かし、揮発しない試薬瓶で保管する。

2) 規準液に生理食塩水を加えて、25 mM に希釈する。

上記の AIM-MEMRI 実験手法は、完璧とは言えないまでも、かなり安定した実験が実施できるレベルに到達したと考えている。本手法に関して、潜在的あるいは顕在的な問題点は、

1) Mn を投与したことによる毒性や神経活動への影響、2) BBB を破綻させたことによる障害の可能性<sup>32)</sup>、3) BBB 破綻の不均一性<sup>35),36)</sup>、4) 麻酔深度による感受性の変化と非特異的な刺激の混入、などである。前述のように、BBB を破綻させたことによる障害として、mannitol の結晶化による脳梗塞 (脳塞栓) や脳圧の急激な変化による脳浮腫の発生である。Fig. 3C に、mannitol を保温せず、さらに 10% mannitol の事前投与 (1.3) を行うことなく、実験を実施した失敗例を 2 例示す。これらの個体では、刺激を加えていないが、Mn の不均一な集積や脳圧上昇による脳浮腫が生じている。

上記手法では、これら 1~3 の問題点をできるだけ最小化するように計画された。しかし、麻酔深度による感受性の変化に関しては、個体差や刺激自体が麻酔深度 (血圧) を変化させるなどの本質的な問題があり、(これはマンガン造影 MRI に限定される問題ではないが)、現状では、各実験系で最適化するしか方法がないという状況である。

筆者らは、本手法を用いて、MRI の連続撮像下において、MRI 内部で刺激する実験を行った<sup>4)</sup>。この実験では、内径 6.5 cm という小さな傾斜磁場装置と比較的大きな撮像範囲

(FOV) を使用したため、計測音が非常に小さな撮像環境下で実施することができた。一方、げっ歯類用としては標準的な内径 12 cm の傾斜磁場装置と 3.2 cm という比較的小さな FOV で同様の実験を実施したところ、撮像開始後、刺激がないにもかかわらず血圧に大きな変動が生じて、Mn が全脳に取り込まれるという結果となった。つまり、BBB が破綻した状態で、Mn を投与中は、非常に小さな刺激に対しても応答が生じて、Mn の蓄積が生じたことが想像される。したがって、傾斜磁場装置から発生する音の影響を受けないよう、外部で刺激を行うことが望ましく、動的撮像を行う場合は、撮像音をできるだけ小さくする条件を設定するか、麻酔深度や Mn 濃度の最適化、および鼓膜の破壊などにより撮像音の影響ができるだけ小さくなるような工夫が必要と考えられる。本手法における MRI 上のコントラストは、麻酔状態によって大きく左右されるため、すべての個体において、全く同じマッピングが得られることは希である。逆に言えば、個々の状態に応じた脳賦活を反映した Mn の集積が、鋭敏に観察できるため、さらなる実験手法の改善や統計手法の導入によって、より安定的な技法になることを望む。

### 「神経構造マンガン造影 MRI」 Neuro-architectural MEMRI

神経構造マンガン造影 MRI は、BBB を破綻させることなく、Mn 投与後 12~24 時間後に、海馬や層構造など脳神経の微細構造に特徴的なコントラストを与えることを目的に開発された手法である。解剖学的な構造を強調するための染色法とも言えるが、一部、機能面も反映するという報告もある。

$\text{MnCl}_2$  を投与あるいは摂取すると、脳の特定の構造に蓄積するという報告は比較的古くから存在する<sup>37)~42)</sup>。例えば、London らは、全身性に投与された Mn が、脳室、松果体、脳下



垂体に集積し、血液脳脊髄液関門から取り込まれることを示唆している。Watanabe らは、3D 撮像法を用いて、 $MnCl_2$  の皮下投与後の動態を詳細に観察し、嗅球や下丘に加えて、とりわけ海馬と歯状回の微細構造が描出されることを示した<sup>43)</sup>。筆者らは、11.7T-MRI を使用して、 $MnCl_2$  の全身性投与 4 日後に、嗅球・皮質・小脳における層構造が描出できることを示し、また血液脳脊髄液関門から脳内への Mn の取り込みを動的に観察した<sup>5)</sup>。また、Lee らは  $MnCl_2$  の投与量および投与後の時間経過を比較し、実験手法を最適化した<sup>44)</sup>。さらに、Mn の全身性投与を用いた病態解析についても数多くの適用例が報告されている。国内では、Tau タンパク過剰発現によるアルツハイマー病モデルの解析<sup>45)</sup>の報告があり、また筆者らは、脳梗塞後に生じるアストログリオーシスの検出について報告した<sup>46)</sup>。Mn がなぜ、脳の特定の構造に集積するかについての議論は、まだ決着していない。因子としては、細胞密度、細胞の  $Ca^{2+}$  取り込みに対する活動性という包括的な見方がある。より詳細には、アストログリアの増殖<sup>46)</sup>、ミクログリアの集積<sup>47)</sup>、Mn-SOD (superoxide dismutase) およびグルタミン酸代謝<sup>48)</sup>、海馬では苔状線維の新芽形成<sup>49),50)</sup> など病態によって、様々な因子の変化を観察することが可能であると報告されている。

このように本手法は、脳神経の微細な解剖学的構造の描出を特徴とする手法であるが、現在、この手法が脳の機能性を反映できるかについて議論されている。Watanabe らは、 $MnCl_2$  の皮下投与後に、細胞間隙から神経に取り込まれた後は、軸索輸送によって運ばれるため、脳機能を反映することを示唆している<sup>43)</sup>。注目される研究としては、Yu らが、 $MnCl_2$  の全身性投与量後、周波数の異なる音を、24 時間聞かせた後、下丘などの神経核において tonotopic マッピングが作成できることを示したものがある<sup>51)</sup>。この報告では、聴覚皮質では信号変化が観察できず、脳幹に近い蝸牛神経核や下

丘などの聴神経核や視床の内側膝状核など、比較的、Mn に対する BBB 透過性が高い領域での信号変化が観察されていることから、適用領域や範囲が限定的ではあるものの、正常な BBB をもつ対象に対して、全身性投与後の  $MnCl_2$  が脳賦活を反映した機能的なマッピングにも使用し得ることを示した重要な研究である。

### 神経構造マンガン造影 MRI (Neuro-architectural MEMRI) の手法

本法の実験手法の流れは、1) Mn を投与、2) 一定期間飼育する、3) MRI 撮像となる。本法は、前出の AIM-MEMRI と比較して、実験手法は極めて簡便であり、かつ安定的である。Mn の投与量や手法が正確であれば、容易に再現性の高い実験を行うことが可能である。一方で、各種感覚刺激による脳機能実験に使用する場合はコントラストが明瞭でないため、前出の AIM-MEMRI と比較して検出力が弱く、詳細な解析を行う必要がある。

#### 1. Neuro-architectural MEMRI 実験手法の例

実験目的は、海馬や嗅球の層構造を描出することとする。MRI の外部にて、麻酔下で Mn を静脈投与し、一定の飼育期間を経て、MRI を撮像する。

皮下、腹腔内、あるいは静脈などから全身性に投与された  $Mn^{2+}$  は、主な経路として、数分以内に血液脳脊髄液関門とも呼ばれる脈絡叢から脳脊髄液中に入り、脳室上衣細胞やくも膜下腔などに接する脳表から脳内に取り込まれ、およそ 12~24 時間かけて脳全体に広がってゆく<sup>5),38)</sup>。脳内の何らかの輸送システムによって広がった Mn は、特定の層構造、歯状回、海馬など、脳の微細構造を描出する。この描出は、 $Mn^{2+}$  投与後に安楽死させた個体では形成されないため、何らかの能動的な機構 ( $Ca^{2+}$  の蓄積、軸索輸送など) が関与していると考えられる。また、BBB が存在しないとされる脳室周囲器官 (脳底部またはその周辺にある領域

で、神経下垂体、最後野、終板血管器官、脳弓下器官など)では、投与直後に信号上昇が観察される。

1) 皮下・腹腔内投与の場合：皮下、腹腔内あるいは静脈投与として、前出手法で浸透圧を調整された  $MnCl_2$  を実験動物に投与する。皮下と腹腔に投与する手法は簡便であるが、大量に投与すると  $MnCl_2$  が接触している組織に損傷を生じさせる可能性がある。明確な比較研究はないが、高くとも 20~30 mM の濃度で、1 時間程度で吸収が終了するような投与量 (おそらく 30 mg/kg 程度) が適切と考える。Xin-Yu らは、腹腔内に 30 mM, 0.4 mmol/kg (85 mg/kg) の  $MnCl_2$  を投与して、24 時間の音刺激による脳賦活を可視化している<sup>51)</sup>。Watanabe らは、皮下に 20 mM, 0.38 mmol/kg (30 mg/kg) の  $MnCl_2$  をグルコース水溶液と混ぜて投与している<sup>43)</sup>。筆者らは、免疫細胞を使用した研究において、2 mM の  $MnCl_2$  に 1 時間程度接触した場合に細胞死が生じ、1 mM では障害が生じないことを示した<sup>5)</sup>。つまり、2 mM 以上の濃度の  $MnCl_2$  に長時間接触することは細胞死を生じさせるため、短時間で吸収され、局所に炎症や障害が生じさせないような配慮が必要である。近年、より少ない毒性で、よりコントラストを高めるために、複数回投与などのプロトコールが検討されている<sup>52)</sup>。

2) 静脈投与の場合：浸透圧調整された  $MnCl_2$  を尾静脈から、インフュージョン・ポンプを用いて、麻酔下で投与する。静脈投与の場合は、Mn が血中で希釈されるため投与濃度や量を増やすことが可能である。筆者らは、最大投与量として静脈投与で、64 mM, 1.8 ml/h, 0.88 mmol/kg (175 mg/kg) の  $MnCl_2$  を使用して層構造の描出を行い<sup>5)</sup>、現在、通常の実験には、64 mM, 1 ml/h, 0.38 mmol/kg (75 mg/kg) を使用している。投与量を増減させることで、どのようなコントラストが得られるかについて、詳細な比較研究がある<sup>44)</sup>。Mn の投与量を増やした場合、動物の管理と Mn の毒性に対する評

価が必要となる。投与速度にも依存するが、麻酔下で Mn を投与する場合、血圧と体温の低下を生じるため、投与中は麻酔深度を低めに保ち (isoflurane では 0.75~1.5% 程度)、体温を維持する必要がある。また、投与後は生理食塩水などを皮下投与 (ラットでは 10 ml/匹) することで補液を行い、さらに 24 時間程度は、保温されたケージに入れて体温を保つ必要がある。175 mg/kg 投与では、組織染色による評価で明確な神経脱落は観察されていないが、投与後 24 時間程度は、行動が鈍くなる鎮静が観察される。

3) 待ち時間：投与後は、24~96 時間程度、覚醒下で飼育する (24 時間は、保温ケージ内での飼育が望ましい)。投与した Mn は 12~24 時間程度で脳室から脳全域に運ばれる。24 時間後においても、海馬や嗅球、あるいは皮質にも層構造の観察が可能である。48~96 時間においては、全体の信号強度は減少するが、コントラストは高くなる場合がある (投与量にも依存する)。

4) MRI 撮像：動物を注意深く MRI 撮像用クレードルに移し、撮像を行う。撮像手法は、 $T_1$  強調画像法あるいは、それに準じた手法を用いる。

上記の Neuro-architectural MEMRI に関する実験手法は、簡便かつ、よく成熟している。本手法の潜在的あるいは顕在的な問題点として、Mn を比較的大量に投与する手法であるため、1) 毒性評価が必要、2) 投与後、動物の状態管理を行う必要がある、などがある。新たにプロトコールを組む場合は、組織学的に細胞変性が生じてないかを、確認する事が望ましい。また、Mn は末梢血管を拡張させて、体温を下げるため、投与量が多い場合は、保温が必須となる。実験の目的に応じて、できるだけ少ない投与量を選択する事を推奨する。室温設定にもよるが、75 mg/kg 以下の投与量であれば、保温の必要性は少ないと考えられる。

実験手法としては、ミエリン形成を含めて微

細構造をより詳細に描出する手法、投与後の脳内における Mn の移動や機能性の反映などが注目される。前述のように、Mn の取り込みは血液脳脊髄液関門が主体であることは疑いないが、 $Mn^{2+}$  が BBB を通過するという報告も多く存在し<sup>25)~30)</sup>、事実、脳室に隣接する視床下部領域では、投与後 1 時間程度で、MRI の信号増強が観察され、透過性の高い脳領域が存在すると考えられる<sup>5),36)</sup>。投与後数分程度の短時間では、MRI で検出可能な濃度には達しないと考えられるが、BBB を通過して脳内に入る経路も、主要ではないものの、存在すると考えられる。

また最近、磁化率移動 (magnetization transfer contrast ; MTC) の手法とマンガン造影 MRI を組み合わせて、ミエリンの分布と近いコントラストを得る方法が報告された<sup>53)~55)</sup>。このように、本手法に対して新たな手法を加えることで、新しい知見をもたらされる可能性がある。

### 「神経経路トレース・マンガン造影 MRI」

#### Tract tracing MEMRI

神経経路トレース・マンガン造影 MRI は、神経軸索の輸送を利用して、末梢と中枢との間の神経経路あるいは中枢内部での経路をトレースする目的に開発された<sup>7),56)</sup>。蛍光色素などと比較して、本法は非破壊で 3 次元的に神経経路が解析できる。また、拡散テンソル MRI による手法が、拡散異方性を指標にした推定的なトレーシングであるのに対して、色素を用いた手法と同様に、造影剤が運搬された経路を直接描出可能であり、シナプスを越えて観察できる<sup>57)</sup>。

本法には、末梢における神経末端 (受容体) 付近に投与し、いわゆる逆行性に使用される手法と<sup>7),56)</sup>、脳内または大槽などの脳室内に投与し、脳内の接続性や順行性トレーサーとして使用される場合とがある<sup>58),59)</sup>。

#### 1. Tract tracing MEMRI 実験手法の例

実験目的は、鼻粘膜に存在する神経終末から、嗅球および嗅覚野までの神経経路をトレースする。MRI の外部で、鼻腔内に  $MnCl_2$  を塗布し、連続的に撮像しながら、Mn の動態を追跡する。

末梢に投与される神経経路トレース・マンガン造影 MRI の適用対象としては、嗅神経経路 (鼻腔内に投与し、嗅球～嗅覚野)、視神経経路 (眼球内に投与し、視神経～視覚野) の二つが最も多い。その理由は、神経学的に注目される経路であることに加えて、鼻粘膜や眼球 (網膜) が、Mn を局所投与する際に都合がよい点にある。経路トレースに使用される Mn は、投与量自体は少ないが、高濃度であるか、低濃度で長時間放出される必要がある (眼球内で 1000 mM, 0.1  $\mu L$ <sup>56)</sup> あるいは鼻腔内で 3900 mM, 0.2  $\mu L$ <sup>60)</sup>)。前述のように高濃度の  $MnCl_2$  を通常の組織内に局所投与すると、局所に細胞死を引き起こし、炎症反応が生じる。一方、鼻粘膜や眼球では、末梢神経終末が密に分布していることに加えて、それらの構造が、適度な「徐放化」の働きをもっているため、 $MnCl_2$  を長時間放出し続けることが可能であると考えられる。

1) 鼻腔内投与の場合：麻酔下で、マイクロピペットを用いて、100～4000 mM の蒸留水で希釈された  $MnCl_2$  水溶液を、0.2  $\mu L$  程度投与 (塗布) する。この際、気管に入らないように気をつける。濃度の選択は、どれくらいの期間追跡するかによる。例えば、嗅神経から嗅糸球体を経由し嗅球付近までであれば、より低濃度 (100 mM 程度) でも可能であるし、シナプスを越えて中枢までの送達経路を観察する場合は、より高い濃度が必要となる (この場合、鼻粘膜に炎症が生じる場合がある)。

2) 眼球内投与の場合：麻酔下で、ハミルトンシリンジにチューブなどで接続された 27～30 ゲージの注射針等を用いて、眼球内に投与する。

3) 脳内投与の場合：麻酔下で、脳定位固定装

置などを使用して、特定の脳部位に投与する。

4) 待ち時間：麻酔下のまま MRI のクレードルに固定して撮像を開始する。あるいは、何らかの感覚刺激を加える場合は、一旦覚醒下に戻し、タスクを加えた後に、再び麻酔導入して撮像する。

5) MRI 撮像：撮像手法は、 $T_1$  強調画像法あるいは、それに準じた手法を用いる。より微細な構造を観察する場合は、局所コイルを使用する。最近では、高速な  $T_1$  マッピングにより定量的に撮像する手法<sup>61)</sup>、連続的な撮像により信号変化を解析する手法、あるいは経路中の 2 点の信号比からインデックスを算出する方法<sup>62)</sup>などが試みられている。

上記の神経経路トレース・マンガン造影 MRI に関する実験手法は、簡便かつ、よく成熟している。脳定位固定など基本的な投与手法を習得すれば、容易に利用できる手法である。本手法の潜在的あるいは顕在的な問題点として、1) 局所の高濃度 Mn が与える細胞障害、2) 拡散など非特異的な分布、3)  $Ca^{2+}$  チャンネルの関与(機能性)がどの程度反映されるか、などがある。

毒性に関しては、前述のように、2 mM を超える Mn が一定時間以上に渡って局所に存在することで細胞毒性を発揮する<sup>63)</sup>。そのため、100 mM 以上という濃度で投与された組織では、炎症反応が生じるとともに、受容体や神経終末が破壊させる可能性がある。研究内容によっては、一定の経路トレースが達成した後は、投与局所の状態は重要でないという場合も多いと思われる。一方で、動物の苦痛除去の観点からは、高濃度  $MnCl_2$  を投与する場合は、投与後の観察を密にして、適切な措置を行う必要がある。

Mn を用いたトレーサーが、2 価の  $Mn^{2+}$  として  $Ca^{2+}$  に擬態することで神経活動に対応した機能性をもつのか、あるいはエンドサイトーシスなどによって細胞内に取り込まれた後は軸索の能動輸送に依存するのか、などトレーサー

のふるまいに関する議論が続いている。神経活動に対応した機能性をもつという主張は、嗅覚刺激に依存した輸送と集積が生じるとした研究に始まり<sup>64)</sup>、国内でも BOLD を使った fMRI との比較した研究がある<sup>65)</sup>。多くの神経トレーサーに共通した問題であるが、軸索による能動輸送に加えて、拡散などの非特異的な移動が加わる可能性は否定できない。Bearer らは、kinesin light chain 1 ノックアウト・マウスを使って、視神経での神経経路トレースに、キネシンの関与は含まれるものの、本質的でない(つまり軸索間隙の拡散による移動が主要な移動メカニズムだ)という否定的な論文を発表した<sup>66)</sup>。その後、逆行性トレーサーとの有意な相関を示した肯定的な論文の発表もあり<sup>67)</sup>、議論が続いている。キネシンは、順行性の速い成分を担う微小管依存性のモーター蛋白質である。この関与が否定され、軸索間隙を拡散で広がるような因子が混在していたとしても、Mn が神経経路トレーサーとして担う役割は、大きいと考える。例えば、アルツハイマー病において、トレース量が低下するという報告がある<sup>60),68),69)</sup>。これは、仮にキネシン・モーター蛋白質の障害を直接示すことができなくても、軸索の太さや細胞密度を含めた輸送能の低下を反映する重要な指標になると考えられる。

脳内投与による神経経路トレース・マンガン造影 MRI も、脳内における接続や連携あるいは可塑的な変化を研究する上で重要な手法である。最も初期に行われた美しい手法は、カナリアの求愛期における脳の可塑的な変化を、脳内投与による神経経路トレース MEMRI によって可視化したベルギーの研究者 Annemie Van der Linden らの研究である<sup>58)</sup>。また、理研とドイツ・チュービンゲンのマックスプランク研究所と共同して実施したマカサルでの脳内連携を可視化した報告<sup>59)</sup>、脳内投与後に皮質層構造の接続および皮質と視床との連携を可視化した研究<sup>70),71)</sup>など、数多くの応用が報告されている。また、水分子の拡散異方性によって推

定される神経経路と生体に注入された Mn の動きとの相関についてラット<sup>72)</sup>およびマウス<sup>73)</sup>で検討されるなど、臨床でも使用可能な拡散テンソル MRI における適切な閾値設定や精度検証について、MEMRI との比較において検討が行われている。

## その他の「マンガン造影 MRI」

マンガン造影 MRI の適用範囲は、脳に留まらず、幅広い臓器や病態に及んでいる。

### 1. 細胞標識 (Manganese cell labeling)

現時点で、細胞標識を行う手法は、 $T_2^*$  効果による高い検出力を誇る酸化鉄微粒子によるものが主流であり、幹細胞、免疫細胞、あるいは受精卵など幅広い応用が報告されている<sup>74)~77)</sup>。筆者らは、免疫細胞を使って、初めて Mn による細胞標識の可能性について報告した<sup>63),78)</sup>。Mn は、酸化鉄微粒子に比べて、検出力は低いものの、 $T_1$  強調画像で信号上昇をもたらす「陽性造影剤」としての使用が期待できるため、例えば腹腔内など、空気や食物の存在により不均一な信号を呈する臓器では、より視認性が向上する。また、ベクターやプラスミドなどの導入法を使わなくても、非食系系の細胞にも、容易に取り込ませることができる (0.2~0.5 mM となる  $MnCl_2$  を栄養を含む培養液に加えて、15~30 分程度インキュベートするだけ)。最近、ヒト幹細胞等に対する応用が発表されている<sup>79)~81)</sup>。この手法は、検出力が低い場合、経静脈投与による移植細胞の追跡には向かないかも知れないが、少なくとも、局所投与による細胞移植では、十分な信号強度を維持する。

また、細胞標識あるいは追跡を行う新しい造影剤として、Mn (III)-transferrin を使用したもの<sup>82)</sup>、酸化マンガンのナノ粒子を使用したもの<sup>83),84)</sup>等が登場している。

### 2. 心臓

心筋において、Mn はわずかの投与量で可視

化できる細胞内造影剤であり、Tom Hu らは早くから、その inotropy (変力) の変化を検出できることを報告し<sup>85)</sup>、また組織生存性 (viability) のマーカーになることを心筋梗塞モデルを用いて示した<sup>86)</sup>。

### 3. 腫瘍

腫瘍では、Mn-DPDP (Teslascan<sup>®</sup>, GE 社製) を用いた数多くの研究報告があるが、本邦では医薬品として承認されていない。本来の使用目的は、肝腫瘍の検出であるが、その後、カルボキシ・デキストランで被覆された酸化鉄微粒子製剤 (Resovist<sup>®</sup>, バイエル薬品) あるいは、Gd キレートによる造影剤 (EOB Primovist<sup>®</sup>, バイエル薬品) の登場により、肝腫瘍造影剤としてのニーズは減少している。しかし、今後、Mn-DPDP は、肝腫瘍以外の腫瘍に対して有用性が発見される可能性がある。例えば最近、長谷川らは、中皮腫に Mn-SOD が過剰発現することに注目し、MEMRI により中皮腫の造影が可能とする報告を行った<sup>87)</sup>。今後、 $Mn^{2+}$  の安全な徐放化技術の開発に伴って、腫瘍に関する臨床展開も期待される。

### 4. 消化管

日本では、消化管の陰性造影剤として、塩化マンガンの経口による造影剤が認可されている (ボースデル内用液<sup>®</sup>)。磁気共鳴胆道すい管撮影 (magnetic resonance cholangiopancreatography; MRCP) に有用とされ、Mn のもつ  $T_2$  短縮効果を利用し、主として  $T_2$  強調画像における胃と十二指腸の内容物からの高信号を低下させ、結果として胆道およびすい管のコントラストを高めて、診断能の向上に貢献する。 $T_1$  造影効果についても同時に生じるが、 $T_2$  強調画像での陰性造影剤としての利用が、臨床利用での前提となっている。

## おわりに

マンガン造影 MRI (MEMRI) に関して、実験手法の観点から分類して紹介した。1997 年

に発表された Lin&Koretsky による論文から、わずか10年余で、極めて幅広い分野に展開しており、現在も、新しいアイデアが次々と登場しているという状況をご理解頂けたら幸いある。最初に紹介した「神経賦活マンガン造影MRI」(AIM-MEMRI)は、実験手技が極めて複雑であり、麻酔条件など、注意深く実験を行う必要があるが、まさに脱分極を反映した真の脳機能マッピングであり、例えば、ヒゲ一本の刺激さえも検出できるなど、高い検出力を誇る。二番目に紹介した「神経構造マンガン造影MRI」(Neuro-architectural MEMRI)は層構造など微細構造を描出することが可能であり、とりわけ T<sub>1</sub> 強調画像においてコントラストを失う高磁場 MRI では、脳内のランドマークを得るために適した手法である。今後、MTC や位相画像との組み合わせ、あるいは機能マップとしての発展が期待される。三つ目に紹介した「神経経路トレース・マンガン造影MRI」(Tract tracing MEMRI)は、異方性を指標とした従来のトラクト・グラフィと異なり、実際の物質の輸送を可視化する方法である。原理に関する議論が続いているが、送達能が病態を反映している可能性があり、今後、多くの適用例が期待できる。

残念なことに、これらの手法の多くは、基礎的な生物医学への応用に限定される。しかし、FDA で承認された Mn-DPDP を使った適用拡大や、Mn の使用が極めて微量となる細胞標識法に関しては、ヒトに利用できる可能性が高い。また、今後、より安全なキレートや、マンガン徐放化剤、あるいは陰性から陽性に变化する activatable な造影剤の開発も期待でき、より特異性の高い検出が可能で、いわゆる分子イメージング研究としての発展が期待できる。

## 謝 辞

本総説の執筆にあたり、貴重なアドバイスを

頂いた米国国立衛生研究所 (NIH)、国立神経疾患脳梗塞研究所 (NINDS) の Alan P Koretsky 博士、Afonso C Silva 博士に感謝申し上げます。さらに、議論を深めていただいたシンガポール・バイオイメージング研究所の Kai-Hsiang Chuang 博士、明治国際医療大学 (旧：明治鍼灸大学) 脳神経外科学ユニットの田中忠蔵教授・樋口敏宏教授、同医療情報学ユニットの梅田雅宏教授、京都府立医科大学大学院の成瀬昭二博士、放射線医学総合研究所分子イメージング研究センターの菅野 巖博士、國領大介博士、齋藤茂芳技術員、柴田さやか技術員に感謝申し上げます。

## 文 献

- 1) Lauterbur PC : Image formation by induced local interactions : examples employing nuclear magnetic resonance. *Nature* 1973 ; 242 : 190-191
- 2) Lin YJ, Koretsky AP : Manganese ion enhances T<sub>1</sub>-weighted MRI during brain activation : an approach to direct imaging of brain function. *Magn Reson Med* 1997 ; 38 : 378-388
- 3) Koretsky AP, Silva AC : Manganese-enhanced magnetic resonance imaging (MEMRI). *NMR Biomed* 2004 ; 17 : 527-531
- 4) Aoki I, Tanaka C, Takegami T, et al. : Dynamic activity-induced manganese-dependent contrast magnetic resonance imaging (DAIM MRI). *Magn Reson Med* 2002 ; 48 : 927-933
- 5) Aoki I, Wu YJ, Silva AC, Lynch RM, Koretsky AP : *In vivo* detection of neuroarchitecture in the rodent brain using manganese-enhanced MRI. *Neuroimage* 2004 ; 22 : 1046-1059
- 6) Lin YJ. Carnegie Mellon University (1997)
- 7) Pautler RG, Silva AC, Koretsky AP : *In vivo* neuronal tract tracing using manganese-enhanced magnetic resonance imaging. *Magn Reson Med* 1998 ; 40 : 740-748
- 8) Hunter DR, Komai H, Haworth RA, Jackson MD, Berkoff HA : Comparison of Ca<sup>2+</sup>, Sr<sup>2+</sup>, and Mn<sup>2+</sup> fluxes in mitochondria of the perfused rat heart. *Circ Res* 1980 ; 47 : 721-727

- 9) Shibuya I, Douglas WW : Indications from Mn-quenching of Fura-2 fluorescence in melanotrophs that dopamine and baclofen close Ca channels that are spontaneously open but not those opened by high  $[K^+]_O$ ; and that Cd preferentially blocks the latter. *Cell Calcium* 1993 ; 14 : 33-44
- 10) Keen CL, Zidenberg-Cherr S : Manganese. Present knowledge in nutrition. Ziegler EE, Filer LJ Washington DC, ILSI Press, 1996 ; 334-343
- 11) Keen CL, Zidenberg-Cherr S, Lonnerdal B. Nutritional and toxicological aspects of manganese intake : an overview. In : Mertz W, Abernathy CO, Olin SS, eds. Risk assessment of essential elements. Washington DC, ILSI Press, 1994 ; 221-235
- 12) Davis CD, Zech L, Greger JL : Manganese metabolism in rats : an improved methodology for assessing gut endogenous losses. *Proc Soc Exp Biol Med* 1993 ; 202 : 103-108
- 13) Malecki EA, Radzanowski GM, Radzanowski TJ, Gallaher DD, Greger JL : Biliary manganese excretion in conscious rats is affected by acute and chronic manganese intake but not by dietary fat. *J Nutr* 1996 ; 126 : 489-498
- 14) Ogawa S, Lee TM : Magnetic resonance imaging of blood vessels at high fields : *in vivo* and *in vitro* measurements and image simulation. *Magn Reson Med* 1990 ; 16 : 9-18
- 15) Ogawa S, Lee TM, Kay AR, Tank DW : Brain magnetic resonance imaging with contrast dependent on blood oxygenation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990 ; 87 : 9868-9872
- 16) Ogawa S, Lee TM, Nayak AS, Glynn P : Oxygenation-sensitive contrast in magnetic resonance image of rodent brain at high magnetic fields. *Magn Reson Med* 1990 ; 14 : 68-78
- 17) Aoki I. Meiji University of Oriental Medicine (1998)
- 18) Duong TQ, Silva AC, Lee SP, Kim SG : Functional MRI of calcium-dependent synaptic activity : cross correlation with CBF and BOLD measurements. *Magn Reson Med* 2000 ; 43 : 383-392
- 19) Morita H, Ogino T, Seo Y, Fujiki N, Tanaka K, Takamata A, Nakamura S, Murakami M : Detection of hypothalamic activation by manganese ion contrasted T(1)-weighted magnetic resonance imaging in rats. *Neurosci Lett* 2002 ; 326 : 101-104
- 20) Lu H, Xi ZX, Gitajn L, Rea W, Yang Y, Stein EA : Cocaine-induced brain activation detected by dynamic manganese-enhanced magnetic resonance imaging (MEMRI). *Proc Natl Acad Sci USA* 2007 ; 104 : 2489-2494
- 21) Henning EC, Meng X, Fisher M, Sotak CH : Visualization of cortical spreading depression using manganese-enhanced magnetic resonance imaging. *Magn Reson Med* 2005 ; 53 : 851-857
- 22) Weng JC, Chen JH, Yang PF, Tseng WY : Functional mapping of rat barrel activation following whisker stimulation using activity-induced manganese-dependent contrast. *Neuroimage* 2007 ; 36 : 1179-1188
- 23) Maynard LS, Cotzias GC : The partition of manganese among organs and intracellular organelles of the rat. *J Biol Chem* 1955 ; 214 : 489-495
- 24) Kaur G, Hasan SK, Srivastava RC : The distribution of manganese-54 in fetal, young and adult rats. *Toxicol Lett* 1980 ; 5 : 423-426
- 25) Aschner M, Aschner JL : Manganese transport across the blood-brain barrier : relationship to iron homeostasis. *Brain Res Bull* 1990 ; 24 : 857-860
- 26) Aschner M, Aschner JL : Manganese neurotoxicity : cellular effects and blood-brain barrier transport. *Neurosci Biobehav Rev* 1991 ; 15 : 333-340
- 27) Aschner M, Gannon M : Manganese (Mn) transport across the rat blood-brain barrier : saturable and transferrin-dependent transport mechanisms. *Brain Res Bull* 1994 ; 33 : 345-349
- 28) Dickinson TK, Devenyi AG, Connor JR : Distribution of injected iron 59 and manganese 54 in hypotransferrinemic mice. *J Lab Clin Med* 1996 ; 128 : 270-278
- 29) Kabata H, Matsuda A, Yokoi K, Kimura M, Itokawa Y : [The effect of the dosage and route of manganese administration on manganese concentration in rat brain]. *Nippon Eiseigaku Zasshi* 1989 ; 44 : 667-672
- 30) Rabin O, Hegedus L, Bourre JM, Smith QR : Rapid brain uptake of manganese (II) across the

- blood-brain barrier. *J Neurochem* 1993 ; 61 : 509-517
- 31) Aoki I, Naruse S, Tanaka C : Manganese-enhanced magnetic resonance imaging (MEMRI) of brain activity and applications to early detection of brain ischemia. *NMR Biomed* 2004 ; 17 : 569-580
  - 32) Tomiwa K, Hazama F, Mikawa H : Reversible osmotic opening of the blood-brain barrier. Prevention of tissue damage with filtration of the perfusate. *Acta Pathol Jpn* 1982 ; 32 : 427-435
  - 33) Gerdin B, McCann E, Lundberg C, Arfors KE : Selective tissue accumulation of manganese and its effect on regional blood flow and haemodynamics after intravenous infusion of its chloride salt in the rat. *Int J Tissue React* 1985 ; 7 : 373-380
  - 34) Silva AC, Lee JH, Aoki I, Koretsky AP : Manganese-enhanced magnetic resonance imaging (MEMRI) : methodological and practical considerations. *NMR Biomed* 2004 ; 17 : 532-543
  - 35) Brown RC, Egleton RD, Davis TP : Mannitol opening of the blood-brain barrier : regional variation in the permeability of sucrose, but not 86Rb + or albumin. *Brain Res* 2004 ; 1014 : 221-227
  - 36) Bhattacharjee AK, Kondoh T, Nagashima T, Ikeda M, Ehara K, Tamaki N : Quantitative analysis of papaverine-mediated blood-brain barrier disruption in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2001 ; 289 : 548-552
  - 37) Koenig SH, Brown RD, 3rd, Goldstein EJ, Burnett KR, Wolf GL : Magnetic field dependence of proton relaxation rates in tissue with added Mn<sup>2+</sup> : rabbit liver and kidney. *Magn Reson Med* 1985 ; 2 : 159-168
  - 38) London RE, Toney G, Gabel SA, Funk A : Magnetic resonance imaging studies of the brains of anesthetized rats treated with manganese chloride. *Brain Res Bull* 1989 ; 23 : 229-235
  - 39) Newland MC, Ceckler TL, Kordower JH, Weiss B : Visualizing manganese in the primate basal ganglia with magnetic resonance imaging. *Exp Neurol* 1989 ; 106 : 251-258
  - 40) Plowchalk DR, Jordan JP, Thomford PJ, Mattison DR : Effects of manganese (Mn<sup>++</sup>) and iron (Fe<sup>+++</sup>) on magnetic resonance imaging (MRI) characteristics of human placenta and amniotic fluid. *Physiol Chem Phys Med NMR* 1987 ; 19 : 35-41
  - 41) Wan XM, Fu TC, Smith PH, Brainard JR, London RE : Magnetic resonance imaging study of the rat cerebral ventricular system utilizing intracerebrally administered contrast agents. *Magn Reson Med* 1991 ; 21 : 97-106
  - 42) Wan X, Fu TC, London RE : Charge dependence of the distribution of contrast agents in rat cerebral ventricles. *Magn Reson Med* 1992 ; 27 : 135-141
  - 43) Watanabe T, Natt O, Boretius S, Frahm J, Michaelis T : *In vivo* 3D MRI staining of mouse brain after subcutaneous application of MnCl<sub>2</sub>. *Magn Reson Med* 2002 ; 48 : 852-859
  - 44) Lee JH, Silva AC, Merkle H, Koretsky AP : Manganese-enhanced magnetic resonance imaging of mouse brain after systemic administration of MnCl<sub>2</sub> : dose-dependent and temporal evolution of T<sub>1</sub> contrast. *Magn Reson Med* 2005 ; 53 : 640-648
  - 45) Kimura T, Yamashita S, Fukuda T, Park JM, Murayama M, Mizoroki T, Yoshiike Y, Sahara N, Takashima A : Hyperphosphorylated tau in parahippocampal cortex impairs place learning in aged mice expressing wild-type human tau. *EMBO J* 2007 ; 26 : 5143-5152
  - 46) Kawai Y, Aoki I, Umeda M, Higuchi T, Kershaw J, Higuchi M, Silva AC, Tanaka C : *In vivo* visualization of reactive gliosis using manganese-enhanced magnetic resonance imaging. *Neuroimage* 2010 ; 49 : 3122-3131
  - 47) Wideroe M, Olsen O, Pedersen TB, Goa PE, Kavelaars A, Heijnen C, Skranes J, Brubakk AM, Brekken C : Manganese-enhanced magnetic resonance imaging of hypoxic-ischemic brain injury in the neonatal rat. *Neuroimage* 2009 ; 45 : 880-890
  - 48) Yang J, Khong PL, Wang Y, Chu AC, Ho SL, Cheung PT, Wu EX : Manganese-enhanced MRI detection of neurodegeneration in neonatal hypoxic-ischemic cerebral injury. *Magn Reson Med* 2008 ; 59 : 1329-1339
  - 49) Nairismagi J, Pitkanen A, Narkilahti S, Huttunen J, Kauppinen RA, Grohn OH : Man-



- ganese-enhanced magnetic resonance imaging of mossy fiber plasticity *in vivo*. *Neuroimage* 2006 ; 30 : 130–135
- 50) Immonen RJ, Kharatishvili I, Sierra A, Einula C, Pitkanen A, Grohn OH : Manganese enhanced MRI detects mossy fiber sprouting rather than neurodegeneration, gliosis or seizure-activity in the epileptic rat hippocampus. *Neuroimage* 2008 ; 40 : 1718–1730
- 51) Yu X, Wadghiri YZ, Sanes DH, Turnbull DH : *In vivo* auditory brain mapping in mice with Mn-enhanced MRI. *Nat Neurosci* 2005 ; 8 : 961–968
- 52) Gruenecker B, Kaltwasser SF, Peterse YH, Saemann PG, Schmidt M, Wotjak CT, Czisch M. The dose makes the poison-Studying toxicity in MEMRI applications. In : ISMRM, Annual Meeting, Stockholm, Sweden, 2010 ; 313
- 53) Chesnick IE, Todorov TI, Centeno JA, Newbury DE, Small JA, Potter K : Manganese-enhanced magnetic resonance microscopy of mineralization. *Magn Reson Imaging* 2007 ; 25 : 1095–1104
- 54) Boretius S, Gadjanski I, Demmer I, Bahr M, Diem R, Michaelis T, Frahm J : MRI of optic neuritis in a rat model. *Neuroimage* 2008 ; 41 : 323–334
- 55) Watanabe T, Frahm J, Michaelis T : Myelin mapping in the living mouse brain using manganese-enhanced magnetization transfer MRI. *Neuroimage* 2010 ; 49 : 1200–1204
- 56) Watanabe T, Michaelis T, Frahm J : Mapping of retinal projections in the living rat using high-resolution 3D gradient-echo MRI with Mn<sup>2+</sup>-induced contrast. *Magn Reson Med* 2001 ; 46 : 424–429
- 57) Pautler RG, Mongeau R, Jacobs RE : *In vivo* trans-synaptic tract tracing from the murine striatum and amygdala utilizing manganese enhanced MRI (MEMRI). *Magn Reson Med* 2003 ; 50 : 33–39
- 58) Van der Linden A, Verhoye M, Van Meir V, Tindemans I, Eens M, Absil P, Balthazart J : *In vivo* manganese-enhanced magnetic resonance imaging reveals connections and functional properties of the songbird vocal control system. *Neuroscience* 2002 ; 112 : 467–474
- 59) Saleem KS, Pauls JM, Augath M, Trinath T, Prause BA, Hashikawa T, Logothetis NK : Magnetic resonance imaging of neuronal connections in the macaque monkey. *Neuron* 2002 ; 34 : 685–700
- 60) Massaad CA, Amin SK, Hu L, Mei Y, Klann E, Pautler RG : Mitochondrial superoxide contributes to blood flow and axonal transport deficits in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One* 2010 ; 5 : e10561
- 61) Chuang KH, Koretsky A : Improved neuronal tract tracing using manganese enhanced magnetic resonance imaging with fast T(1) mapping. *Magn Reson Med* 2006 ; 55 : 604–611
- 62) Serrano F, Deshazer M, Smith KD, Ananta JS, Wilson LJ, Pautler RG : Assessing transneuronal dysfunction utilizing manganese-enhanced MRI (MEMRI). *Magn Reson Med* 2008 ; 60 : 169–175
- 63) Aoki I, Takahashi Y, Chuang KH, Silva AC, Igarashi T, Tanaka C, Childs RW, Koretsky AP : Cell labeling for magnetic resonance imaging with the T1 agent manganese chloride. *NMR Biomed* 2006 ; 19 : 50–59
- 64) Pautler RG, Koretsky AP : Tracing odor-induced activation in the olfactory bulbs of mice using manganese-enhanced magnetic resonance imaging. *Neuroimage* 2002 ; 16 : 441–448
- 65) Kondoh T, Yamada S, Shioda S, Torii K : Central olfactory pathway in response to olfactory stimulation in rats detected by magnetic resonance imaging. *Chem Senses* 2005 ; 30 Suppl 1 : i172–173
- 66) Bearer EL, Falzone TL, Zhang X, Biris O, Rasin A, Jacobs RE : Role of neuronal activity and kinesin on tract tracing by manganese-enhanced MRI (MEMRI). *Neuroimage* 2007 ; 37 Suppl 1 : S37–46
- 67) Matsuda K, Wang HX, Suo C, McCombe D, Horne MK, Morrison WA, Egan GF : Retrograde axonal tracing using manganese enhanced magnetic resonance imaging. *Neuroimage* 2010 ; 50 : 366–374
- 68) Smith KD, Kallhoff V, Zheng H, Pautler RG : *In vivo* axonal transport rates decrease in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuroimage* 2007 ; 35 : 1401–1408

- 69) Minoshima S, Cross D : *In vivo* imaging of axonal transport using MRI : aging and Alzheimer's disease. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2008 ; 35 Suppl 1 : S89-92
- 70) Soria G, Wiedermann D, Justicia C, Ramos-Cabrer P, Hoehn M : Reproducible imaging of rat corticothalamic pathway by longitudinal manganese-enhanced MRI (L-MEMRI). *Neuroimage* 2008 ; 41 : 668-674
- 71) Tucciarone J, Chuang KH, Dodd SJ, Silva A, Pelled G, Koretsky AP : Layer specific tracing of corticocortical and thalamocortical connectivity in the rodent using manganese enhanced MRI. *Neuroimage* 2009 ; 44 : 923-931
- 72) Lin CP, Tseng WY, Cheng HC, Chen JH : Validation of diffusion tensor magnetic resonance axonal fiber imaging with registered manganese-enhanced optic tracts. *Neuroimage* 2001 ; 14 : 1035-1047
- 73) Yamada M, Momoshima S, Masutani Y, Fujiyoshi K, Abe O, Nakamura M, Aoki S, Tamaoki N, Okano H : Diffusion-tensor neuronal fiber tractography and manganese-enhanced MR imaging of primate visual pathway in the common marmoset : preliminary results. *Radiology* 2008 ; 249 : 855-864
- 74) Bulte JW, Ma LD, Magin RL, Kamman RL, Hulstaert CE, Go KG, The TH, de Leij L : Selective MR imaging of labeled human peripheral blood mononuclear cells by liposome mediated incorporation of dextran-magnetite particles. *Magn Reson Med* 1993 ; 29 : 32-37
- 75) Bulte JW, Zhang S, van Gelderen P, Herynek V, Jordan EK, Duncan ID, Frank JA : Neurotransplantation of magnetically labeled oligodendrocyte progenitors : magnetic resonance tracking of cell migration and myelination. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999 ; 96 : 15256-15261
- 76) Hoehn M, Kustermann E, Blunk J, et al. : Monitoring of implanted stem cell migration *in vivo* : a highly resolved *in vivo* magnetic resonance imaging investigation of experimental stroke in rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002 ; 99 : 16267-16272
- 77) Shapiro EM, Skrtic S, Sharer K, Hill JM, Dunbar CE, Koretsky AP : MRI detection of single particles for cellular imaging. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004 ; 101 : 10901-10906
- 78) Aoki I, Takahashi Y, Chuang K, Igarashi T, Silva AC, Tanaka C, Childs RW, Koretsky AP. *In vitro* cell labeling for manganese enhanced magnetic resonance imaging. In : 12th ISMRM Kyoto, Japan, 2004 ; 164
- 79) Yamada M, Yang P : *In vitro* labeling of human embryonic stem cells for magnetic resonance imaging. *J Vis Exp* 2008 ; Aug 3 (web journal)
- 80) Yamada M, Gurney PT, Chung J, et al. Manganese-guided cellular MRI of human embryonic stem cell and human bone marrow stromal cell viability. *Magn Reson Med* 2009 ; 62 : 1047-1054
- 81) Chung J, Yamada M, Yang PC : Magnetic resonance imaging of human embryonic stem cells. *Curr Protoc Stem Cell Biol* 2009 ; Chapter 5 : Unit 5A 3
- 82) Sotak CH, Sharer K, Koretsky AP : Manganese cell labeling of murine hepatocytes using manganese(III)-transferrin. *Contrast Media Mol Imaging* 2008 ; 3 : 95-105
- 83) Gilad AA, Walczak P, McMahon MT, Na HB, Lee JH, An K, Hyeon T, van Zijl PC, Bulte JW : MR tracking of transplanted cells with "positive contrast" using manganese oxide nanoparticles. *Magn Reson Med* 2008 ; 60 : 1-7
- 84) Huang CC, Khu NH, Yeh CS : The characteristics of sub 10 nm manganese oxide T<sub>1</sub> contrast agents of different nanostructured morphologies. *Biomaterials* 2010 ; 31 : 4073-4078
- 85) Hu TC, Pautler RG, MacGowan GA, Koretsky AP : Manganese-enhanced MRI of mouse heart during changes in inotropy. *Magn Reson Med* 2001 ; 46 : 884-890
- 86) Hu TC, Bao W, Lenhard SC, Schaeffer TR, Yue TL, Willette RN, Jucker BM : Simultaneous assessment of left-ventricular infarction size, function and tissue viability in a murine model of myocardial infarction by cardiac manganese-enhanced magnetic resonance imaging (MEMRI). *NMR Biomed* 2004 ; 17 : 620-626
- 87) Hasegawa S, Koshikawa-Yano M, Saito S, Morokoshi Y, Furukawa T, Aoki I, Saga T : Molecular imaging of mesothelioma by detection

## **Manganese-enhanced Magnetic Resonance Imaging (MEMRI) in Practice**

Ichio AOKI<sup>1</sup> and Yuko KAWAI<sup>2</sup>

*<sup>1</sup>Molecular Imaging Center, National Institute of Radiological Sciences  
Anagawa 4-9-1, Inage, Chiba 263-8555*

*<sup>2</sup>Department of Medical Informatics, Meiji University of Integrated Medicine*

Divalent manganese ions ( $Mn^{2+}$ ) are handled in a similar manner to calcium ions ( $Ca^{2+}$ ) in many biological systems.  $Mn^{2+}$  has been found to be a useful “functional” contrast agent for manganese-enhanced magnetic resonance (MR) imaging (MEMRI) in application like depolarization-dependent functional MR imaging (activity-induced manganese-enhanced MEMRI), neural tract tracing (tract-tracing MEMRI), visualization of neuro-/cytoarchitecture (neuroarchitectural MEMRI), evaluation of cell viability, and estimation of inotropic status of myocardial infarction. Because of its high signal-to-noise ratio (SNR) and high sensitivity, MEMRI allows the use of multi-slice or 3-dimensional MR imaging techniques to map at high spatial resolution. In this review, we classify applications of MEMRI and introduce some of the methodology used for small animals.